



产低温碱性脂肪酶菌株 *Acinetobacter johnsonii* LP28 的鉴定及发酵条件优化

戚薇, 邵静, 王晨, 王海宽

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 从实验室保藏的 49 株碱性脂肪酶产生菌中筛选出产低温碱性脂肪酶菌株 LP28, 初步酶学性质研究表明, 该脂肪酶的最适作用温度为 30 °C, 最适作用 pH 为 9.0, 粗酶液在室温条件下处理 48 h 仍具有 93.78% 的残余酶活. 该菌经 16S rDNA 鉴定为约氏不动杆菌 (*Acinetobacter johnsonii*), 同源率为 99%. 摇瓶实验表明, 该菌株最适产酶培养基为 (g/L): 淀粉 10, 牛肉膏 20, K₂HPO₄ 1, PVA-大豆油 20. 最高酶活为 3.06 U/mL.

关键词: 约氏不动杆菌; 低温碱性脂肪酶; 优化

中图分类号: Q933 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2009)06-0009-04

Identification and Optimization of Fermentation Conditions of *Acinetobacter johnsonii* LP28 Producing Cold-Adapted and Alkaline Lipase

QI Wei, SHAO Jing, WANG Chen, WANG Hai-kuan

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Strain LP28 was selected from the 49 alkaline lipase producing strains preserved in laboratory. The characterization of the crude enzyme exhibited maximum activity at 30 °C and pH 9.0 and retained 93.78% of its maximum activity after remaining 48 h at the room temperature. The strain was identified as *Acinetobacter johnsonii* by 16S rDNA assay and showed 99% homology. The optimal medium for lipase production was determined as follow (g/L): starch 10, beef extract 20, K₂HPO₄ 1, PVA-bean oil 20. The alkaline lipase activity reached maximal level of 3.06 U/mL.

Keywords: *Acinetobacter johnsonii*; cold-adapted and alkaline lipase; optimization

脂肪酶是能够催化长链脂肪酸甘油酯水解和合成的羧酸酯酶^[1], 是当代酶工业最受瞩目的酶种之一^[2]. 脂肪酶广泛存在于许多动植物及微生物中, 已有多种微生物脂肪酶实现商业化生产, 主要应用于洗涤、油脂水解、废水处理、食品加工及化妆品等工业.

不动杆菌产生的脂肪酶具有对酯类的转酯性、水解性、对应选择性^[3]和对溶剂的耐受性等特点, 且有低温活性报道^[4-6], 因此在洗涤、制药、食品、脂类加工、毛纺和低温环境修复等工业上有着巨大的应用潜力. 近年来, 不动杆菌产碱性脂肪酶在国内外虽已有

研究^[6], 但是性质稳定的较少, 且对约氏不动杆菌产脂肪酶的研究并未报道. 本文从实验室保藏的 49 株碱性脂肪酶产生菌中筛选获得 1 株稳定性良好的低温碱性脂肪酶产生菌. 此外, 对该菌所产生的碱性脂肪酶进行了初步酶学性质研究和发酵条件的优化.

1 材料与方法

1.1 菌种来源

本实验室^[7]从渤海湾盐碱地被油污染的土样中

收稿日期: 2009-06-10; 修回日期: 2009-09-18

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (09JCZDJ17800)

作者简介: 戚薇 (1963—), 女, 天津人, 教授; 通信作者: 王海宽, 副教授, haikuanwangcn@yahoo.com.cn.

筛选产碱性脂肪酶的菌株,由天津科技大学微生物菌种保藏管理中心保藏。

1.2 试剂与培养基

1.2.1 试剂

聚乙烯醇-油脂乳化液:取 20 g 聚乙烯醇,加蒸馏水约 800 mL,加热至溶,冷却后定容至 1 000 mL 配成 2%的聚乙烯醇溶液,双层纱布过滤后备用。将大豆油与上述 2%的聚乙烯醇溶液以 1:3 的比例混合。用高速组织捣碎机处理 10 min,即成乳白色聚乙烯醇-大豆油乳化液。以相同方法配制花生油、橄榄油、葵花油、棕榈油、椰子油、芥末油、三丁酸甘油酯的聚乙烯醇-油脂乳化液(PVA-油脂)。

1.2.2 培养基(g/L)

种子培养基:蛋白胨 40,蔗糖 20, K_2HPO_4 1, pH 8.0。

发酵培养基:蛋白胨 40,蔗糖 20, K_2HPO_4 1,大豆油 10, pH 8.0。

斜面保藏培养基:酵母浸出粉 5,蛋白胨 10, NaCl 5,琼脂 20, pH 8.0。

1.3 发酵培养及粗酶液制备

挑取 1 环斜面保藏菌种,接种于 30 mL 种子培养基中,于 28 °C、180 r/min 条件下培养过夜,即为液体种子。2%液体种子接种于 30 mL 发酵培养基中(250 mL 三角瓶),28 °C、180 r/min 培养 36 h。发酵结束后,培养液在 4 °C、8 000 r/min 条件下离心 15 min,取上清液即为粗酶液。

1.4 酶活力测定

1.4.1 平板扩散法

0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 5.0 ~ 8.0)900 mL,琼脂 20 g,121 °C 灭菌 20 min,降温至 60 °C 后加入含有 0.2%的维多利亚蓝 B 的大豆油乳化液 100 mL,混合均匀后倒平板,冷却后打孔,直径为 5 mm。取 20 μ L 粗酶液加入孔中,正置培养 24 h 后测量其出圈大小,以 D/d 值表示相对酶活力的大小,其中 D 表示维多利亚蓝圈直径, d 表示打孔直径^[8-9]。

1.4.2 分光光度法

具体方法参照文献[7]。

脂肪酶 1 个单位的定义:在 pH 8.0、30 °C 条件下,1 min 释放 1 μ mol 对硝基酚所需酶的量,以 U/mL 表示。

1.5 菌株的 16S rDNA 序列测定

煮沸粗提 DNA 法提取 DNA,按照文献[10]对菌体 16S rDNA 序列进行 PCR 扩增,上游引物为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGG-3';下游引物为 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 扩增产物

交由上海桑尼生物技术有限公司进行测序。

2 结果与讨论

2.1 菌株筛选

将保藏的 49 株碱性脂肪酶产生菌进行活化,在 28 °C、pH 9.5 的条件下进行发酵培养,分光光度法测定酶活,初筛出 16 株低温碱性脂肪酶产生菌。进一步以室温放置稳定性为筛选条件,获得 1 株稳定性良好的低温碱性脂肪酶产生菌 *Acinetobacter johnsonii* LP28,所产脂肪酶能在室温条件下稳定保存,放置 48 h 仍具有 93.78%的残余酶活。通过平板扩散法定性研究结果表明,菌株 LP28 所产脂肪酶的最适作用温度为 30 °C,相对酶活达 94.5%,最适 pH 为 9.0,该脂肪酶属于低温碱性脂肪酶。

2.2 菌株鉴定

测得菌株 LP28 的 16S rDNA 基因序列,与 GenBank 中核酸数据进行比对,确定为约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*),同源率为 99%,目前国内外已有不动杆菌产脂肪酶的研究,但是未见约氏不动杆菌的相关文献报道。Kasana^[11]报道的 *Acinetobacter lwoffii* CR9 以及 Lee^[3]报道的 *Acinetobacter* sp.ES-1 所产脂肪酶最适温度为 40 °C;Yoon^[12]报道的 *Acinetobacter junii* SY-01 脂肪酶最适作用温度为 45 ~ 50 °C。与之相比,本文所述的脂肪酶具有更低的最适作用温度,在洗涤工业的应用中更有节能潜力。

2.3 菌株发酵条件的优化

2.3.1 碳源对产酶的影响

以发酵培养基为基础,改变不同的碳源及其含量,在接种量 2%、28 °C、180 r/min 发酵培养 36 h 后,将发酵液于 4 °C、10 000 r/min 冷冻离心 10 min,取上清液获得粗酶液。用分光光度法测定酶活力,结果见表 1。结果表明,碳源为 1%淀粉时酶活最高,为 2.10 U/mL。另外,葡萄糖对 LP28 菌株产脂肪酶具有一定的抑制作用,这与 Mongkolthanasakul W^[13]报道的一致。

表 1 碳源对产酶的影响

Tab.1 Effect of carbon sources on lipase production

碳源	酶活/ (U·mL ⁻¹)	碳源	酶活/ (U·mL ⁻¹)
葡萄糖 0.5%	0.56	淀粉 0.5%	1.57
葡萄糖 1.0%	0.45	淀粉 1.0%	2.10
葡萄糖 1.5%	0.42	淀粉 1.5%	1.99
蔗糖 0.5%	1.23	糊精 0.5%	1.20
蔗糖 1.0%	1.98	糊精 1.0%	1.63
蔗糖 1.5%	1.58	糊精 1.5%	1.58

2.3.2 氮源对产酶的影响

以上述优化培养基为基础,改变不同的氮源,采用上述方法发酵测酶活力,结果见表 2. 结果表明,菌株 LP28 利用不同氮源产脂肪酶的差别较大,其中有机氮源更利于脂肪酶的产生,本文以牛肉膏为氮源时产酶最好,最高酶活为 2.20 U/mL.

表 2 氮源对产酶的影响

Tab.2 Effect of nitrogen sources on lipase production

氮源	酶活/ (U·mL ⁻¹)	氮源	酶活/ (U·mL ⁻¹)
牛肉膏	2.20	蛋白胨	0.86
豆饼粉	1.50	酵母膏	1.29
玉米浆	1.40	玉米粉	0.77
棉籽饼粉	1.18	NaNO ₃	0.83
蛋白胨	1.76	NH ₄ NO ₃	0.71

2.3.3 诱导剂对产酶的影响

(1) 不同诱导剂对产酶的影响

对于诱导型脂肪酶,诱导物质及其用量是产酶的最主要因素. 文献[3, 14-15]报道不动杆菌多为诱导型产酶,但对不同链长的酯类利用情况不同. 据文献[7]报道,聚乙烯醇-油脂乳化液对脂肪酶产生的诱导更佳,本实验在上述优化培养基的基础上,分别添加 1%的聚乙烯醇-油脂乳化液(PVA-油脂),并采用上述方法发酵测酶活力,结果见表 3. 结果表明,PVA-油脂较普通油脂诱导剂的诱导效果明显提高,以 PVA-橄榄油和 PVA-大豆油的诱导效果最佳,最高酶活达 2.58 U/mL. 但是,鉴于大豆油的成本较橄榄油更为低廉,本实验采用 PVA-大豆油为最优诱导物质进行后续研究.

表 3 不同诱导物质对产酶的影响

Tab.3 Effect of different inducers on lipase production

诱导物质	酶活/(U·mL ⁻¹)
大豆油(对照)	2.16
PVA-大豆油	2.50
PVA-花生油	1.25
PVA-橄榄油	2.58
PVA-葵花油	1.80
PVA-棕榈油	1.31
PVA-椰子油	1.69
PVA-芥末油	1.49
PVA-三丁酸甘油酯	1.20

(2) 诱导剂添加量对产酶的影响

以 PVA-大豆油为诱导物质,分别添加 0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%,参照以上方法发酵测酶活力,结果如图 1 所示. 结果表明,PVA-大豆油添加量为 2%时酶活力最高,为 2.6

U/mL. 另外,随着诱导物质添加量的增加酶活力降低,这说明过量的油脂对菌株 LP28 的产酶具有抑制作用.

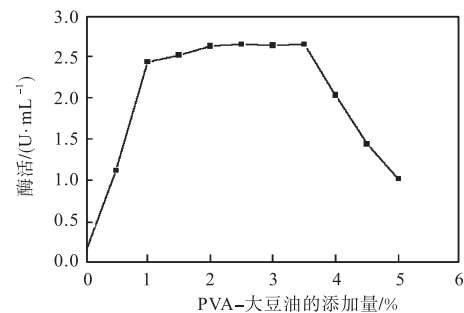


图 1 PVA-大豆油的添加量对产酶的影响

Fig.1 Effect of different volumes of PVA-soybean oil on lipase production

2.3.4 初始 pH 对产酶的影响

用 HCl 或 NaOH 调节上述优化后发酵培养基的 pH 在 4.0~13.0 范围内,依上述方法发酵测酶活力,结果如图 2 所示. 结果表明,初始 pH 7.0~9.0 范围内均适于产酶,且 pH 9.0 的酶活最高,为 2.67 U/mL.

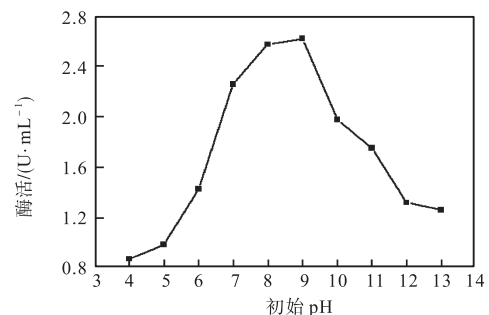


图 2 初始 pH 对产酶的影响

Fig.2 Effect of initiative pH on lipase production

2.3.5 温度对产酶的影响

控制发酵温度在 20~50 °C 范围内,依上述方法发酵测酶活力,结果如图 3 所示. 结果表明,低温条件下培养有利于产酶,最适产酶温度为 30 °C,最高酶活为 2.93 U/mL.

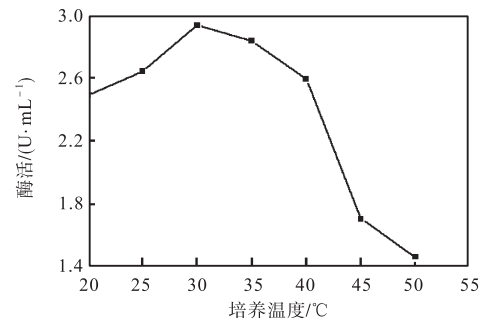


图 3 温度对产酶的影响

Fig.3 Effect of temperature on lipase production

2.3.6 装液量对产酶的影响

采用上述发酵条件,研究不同的装液量对产酶的影响,结果如图4所示。结果表明,最适装液量为30 mL,最高酶活为3.06 U/mL。装液量较大对产酶有抑制作用,该菌的产酶需要较高的溶氧。

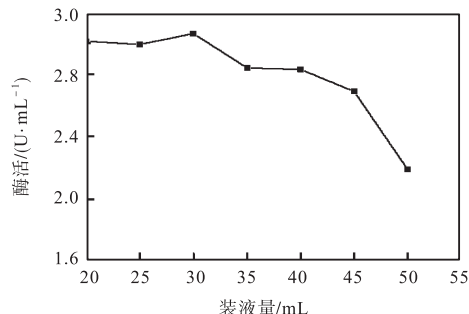


图4 装液量对产酶的影响

Fig.4 Effect of liquid volume on lipase production

3 结论

从实验室保藏的49株碱性脂肪酶产生菌中筛选出1株具有低温碱性脂肪酶活性的菌株LP28,对该脂肪酶的酶学性质进行初步研究,发现其最适作用温度为30℃,最适pH为9.0,具有应用于洗涤剂行业的潜力。

16S rDNA 鉴定结果表明,该菌属于约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*)。本文对其产酶条件进行了优化,摇瓶实验表明,最优产酶培养基为(g/L):淀粉10,牛肉膏20,K₂HPO₄1,PVA-大豆油20;最优培养温度30℃、装液量30 mL、初始pH为9.0。其最高酶活为3.06 U/mL。在下一步工作中将通过诱变育种、基因改组等技术进一步提高此菌的产酶能力,使其在碱性洗涤剂领域发挥作用。

参考文献:

- [1] Jaeger K E, Dijkstra B W, Reetz M T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases[J]. Annual Review of Microbiology, 1999, 53: 315-351.
- [2] Hasan F, Shah A A, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(2): 235-251.
- [3] Lee K W, Shin G S, Bae H A, et al. Isolation and characterization of *Acinetobacter* sp. ES-1 excreting a lipase with high enantioselectivity for (S)-ketoprofen ethyl ester[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(21): 1639-1642.
- [4] Breuil C, Kushner D J. Lipase and esterase formation by psychrophilic and mesophilic *Acinetobacter* species[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1975, 21(4): 423-433.
- [5] Dharmsthiti S, Pratuangdejkul J, Theeragool G, et al. Lipase activity and gene cloning of *Acinetobacter calcoaceticus* LP009[J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1998, 44(2): 139-145.
- [6] Sullivan E R, Leahy J G, Colwell R R. Cloning and sequence analysis of the lipase and lipase chaperone-encoding genes from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, and redefinition of a Proteobacterial lipase family and an analogous lipase chaperone family[J]. Gene, 1999, 230(2): 277-286.
- [7] 刘瑞娟, 王海宽, 路福平, 等. 低温碱性脂肪酶产生菌的筛选及产酶培养基的优化[J]. 天津科技大学学报, 2009, 24(1): 6-10.
- [8] 施巧琴. 碱性脂肪酶的研究——I. 菌株的分离和筛选[J]. 微生物学通报, 1981, 8(3): 108-110.
- [9] 吴敏辰, 孙崇荣, 吴显章. 平板扩散法粗略确定碱性脂肪酶的活性[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(2): 168-172.
- [10] 林容霞, 马延和, 谭天伟. 低温脂肪酶产生菌的筛选及鉴定[J]. 北京化工大学学报, 2006, 33(1): 31-35.
- [11] Kasana R C, Kaur B, Yadav S K. Isolation and identification of a psychrotrophic *Acinetobacter* sp. CR9 and characterization of its alkaline lipase[J]. Journal of Basic Microbiology, 2008, 48(3): 207-212.
- [12] Yoon M Y, Shin P K, Han Y S, et al. Isolation of an *Acinetobacter junnu* SY-01 strain producing an extracellular lipase enantioselectively hydrolyzing Itraconazole precursor, and some properties of the lipase[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004, 14(1): 97-104.
- [13] Mongkolthananuk W, Probnarong W, Lertsiri S, et al. Growth and lipase production of a psychrotrophic *Acinetobacter calcoaceticus* in an MSG-containing medium[J]. Journal of General and Applied Microbiology, 2004, 50(1): 29-33.
- [14] CHEN Shu-jen, CHENG Chu-yuan, CHEN The-liang. Production of an alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens* [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 86(3): 308-312.
- [15] LI Chen-you, CHENG Chu-yuan, CHEN The-liang. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 19(1): 25-31.